(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2013-237673
(P2013-237673A)
(43)公開日　平成25年11月28日(2013.11.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/145	(2006.01)	A61K	39/145	ZNA	4B024
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39		4C085
A61P 31/16	(2006.01)	A61P	31/16		4H045
C07K 14/11	(2006.01)	C07K	14/11		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	

審査請求 有　請求項の数 8　OL　（全 13 頁）

(21)出願番号　特願2013-127162 (P2013-127162)
(22)出願日　平成25年6月18日 (2013.6.18)
(62)分割の表示　特願2010-525677 (P2010-525677)の分割
原出願日　平成21年8月13日 (2009.8.13)
(31)優先権主張番号　特願2008-210021 (P2008-210021)
(32)優先日　平成20年8月18日 (2008.8.18)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

（出願人による申告）平成１９年度、経済産業省、戦略的技術開発委託費（植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発／植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発に係るもの）（国庫債務負担行為に係るもの）、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願

(71)出願人　511018642
北里第一三共ワクチン株式会社
埼玉県北本市荒井六丁目１１１番地
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを併用したトリインフルエンザワクチンの追加免疫方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】オイルワクチンによる初回免疫で付与された免疫をより長期間にわたって高いレベルで維持することが可能なトリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む、免疫材料の提供。
【解決手段】オイルワクチンを筋肉内接種した鶏に対して、ELISA抗体価が減少した時点で、遺伝子組換え技術により作成した組み換えHA抗原及び組み換えNP抗原と粘膜アジュバントである合成オリゴCpGを経口投与し、オイルワクチンで付与した免疫応答が弱化しても、組み換えHA抗原及び組み換えNP抗原と合成オリゴCpGを混合して経口投与することで抗体価が再誘導された、免疫材料。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
トリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む、免疫材料。
【請求項２】
トリインフルエンザウイルス抗原が、組み換えＨＡ抗原及び組み換えＮＰ抗原である、請求項１に記載の免疫材料。
【請求項３】
トリインフルエンザを予防するための、請求項１又は２に記載の免疫材料。
【請求項４】
経口投与するための、請求項１～３のいずれかに記載の免疫材料。
【請求項５】
追加免疫のための、請求項１～４のいずれかに記載の免疫材料。
【請求項６】
トリインフルエンザワクチンを投与された動物に対し、請求項１～５のいずれかに記載の免疫材料を追加投与し、初回免疫で付与された免疫を再誘導させる方法。
【請求項７】
動物が鳥である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
追加投与が経口投与である、請求項６又は７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、家禽、特に鶏に対するワクチン接種に関する。具体的には、注射型のオイルワクチンで初回免疫された家禽を対象とする、追加免疫の免疫材料および方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
2008年現在、東南アジアを中心に鳥類に感染するインフルエンザが流行しており、特に養鶏業界は甚大な被害を被っている (Bagchi, (2008) CMAJ, 178:1415)。さらに、H5N1亜型の高病原性株がヒトに感染する例も散発しており、新型インフルエンザとしての大流行が危惧されている (Wright, (2008) N. Engl. J. Med., 358:2540-2543)。このような背景から、トリインフルエンザウイルス対策は公衆衛生上、重要な課題である。
トリインフルエンザの予防手段として、ワクチンの投与による免疫誘導が有効であるため、わが国でも筋肉内接種による注射型オイルワクチンが製造および備蓄されている。このワクチンで付与した免疫をより長期間にわたって高いレベルで維持することができれば、非常に効果的な予防手段となり得る。しかしそのための既存の手段は有効性、価格、簡便さ、等の点で不十分であった。
例えば、インフルエンザワクチンの素材を作製する方法としては、「センダイウイルスベクターを用いたワクチンおよびワクチンタンパク質（特許公開2000-253876）」や「ワクチンおよび遺伝子治療用の組換えインフルエンザウイルス（特許公開2003-528570）」、「リバースジェネティック法を利用しタンパク質ワクチンとトリインフルエンザワクチンを開発する方法（特許公開2007-282636）」などがあるが、いずれも追加免疫に言及するものではない。
また、A. D. Altsteinらは組換えNPのマウスに対する追加免疫を実施したが、その投与経路は腹腔投与である（Altstein et al. (2006) Arch. Virol.;151: 921-931）。さらに、G. Le Gall-Reculeらも鶏に対するオイルワクチンの追加免疫を実施しているが、その投与経路は皮下接種である（G. Le Gall-Recule et al. (2007) Avian Dis.;51: 490-494）。また、Y. Asahi-Ozakiらは、リバースジェネティクス法で作出した組換えウイルスを用いたHAワクチンを作製し、これを経鼻投与した試験を報告している（Y. Asahi-Ozaki et al. (2006) Microbes Infect.;8: 2706-2714）。

以上のように、組換えタンパク質抗原を用いた鶏に対する経口追加免疫の方法としては、有効な事例がなかった。

【０００３】

なお、以下に本発明に関連する先行技術文献を示す。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００４】

【特許文献１】特許公開2000-253876号
【特許文献２】特許公開2003-528570号
【特許文献３】特許公開2007-282636号

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Bagchi, (2008) CMAJ, 178:1415
【非特許文献２】Wright, (2008) N. Engl. J. Med., 358:2540-2543
【非特許文献３】Altstein et al. (2006) Arch. Virol.;151: 921-931
【非特許文献４】G. Le Gall-Recule et al. (2007) Avian Dis.;51: 490-494
【非特許文献５】Y. Asahi-Ozaki et al. (2006) Microbes Infect.;8: 2706-2714
【非特許文献６】Eliasson D. G. et al. Vaccine (2008) 26:1243-52
【非特許文献７】Sylte M. J. et al. Vaccine (2007) 25:3763-72
【非特許文献８】Ohba K. et al. Vaccine (2007) 25:4291-300
【非特許文献９】Roy S. et al. Vaccine (2007) 25:6845-51
【非特許文献１０】Huleatt J. W. et al. Vaccine (2008) 26:201-14
【非特許文献１１】Webster R. G. et al. Vaccine (1991) 9:303-8
【非特許文献１２】Ilyinskii P. O. et al. Vaccine (2008) 26:2177-85
【非特許文献１３】Zanvit P. et al. Immunol. Lett. (2008) 115:144-52
【非特許文献１４】Isaka M. et al. Microbiol. Immunol. (2008) 52:55-63
【非特許文献１５】Horthongkham N. et al. J. Immune. Based Ther. Vaccines (2007) 5:10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明は、オイルワクチンによる初回免疫で付与された免疫をより長期間にわたって高いレベルで維持することが可能な免疫材料の提供、及び簡便かつ合理的な追加免疫方法の確立を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明者らは、トリインフルエンザ予防に効果的な抗原とされるHAおよびNPタンパク質を組換えDNA技術により作成した。この組み換えＨＡ抗原及び組み換えＮＰ抗原に粘膜アジュバントである合成オリゴCpGを添加して、オイルワクチンを筋肉内接種した鶏に経口投与した。その結果、オイルワクチンで付与した免疫応答が弱化しても、組み換えＨＡ抗原及び組み換えＮＰ抗原と合成オリゴCpGを混合して経口投与することで、抗体産生が再誘導された。なお、今回の発明のワクチンは、初回免疫に使用する場合は無効または効果が弱く、追加免疫に使用する場合に有効であった。

即ち本発明は、以下〔１〕～〔１０〕を提供するものである。

〔１〕トリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む、免疫材料。

〔２〕トリインフルエンザウイルス抗原が、組み換えＨＡ抗原及び組み換えＮＰ抗原である、〔１〕に記載の免疫材料。

〔３〕トリインフルエンザを予防するための、〔１〕又は〔２〕に記載の免疫材料。

〔４〕経口投与するための、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の免疫材料。

〔５〕追加免疫のための、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の免疫材料。
〔６〕トリインフルエンザワクチンを投与された動物に対し、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の免疫材料を追加投与し、初回免疫で付与された免疫を再誘導させる方法。
〔７〕動物が鳥である、〔６〕に記載の方法。
〔８〕追加投与が経口投与である、〔６〕又は〔７〕に記載の方法。
〔９〕トリインフルエンザに対するワクチンを投与された動物において初回免疫で付与された免疫を再誘導させるための薬剤の製造における、〔１〕～〔５〕に記載の免疫材料の使用。
〔１０〕トリインフルエンザに対するワクチンを投与された動物において初回免疫で付与された免疫を再誘導させる方法に使用するための、〔１〕～〔５〕に記載の免疫材料の使用。
【図面の簡単な説明】
【０００８】
【図１】A/duck/Mongolia/54/01 (H5N2)株のHAを遺伝子供与体とした組換え酵母発現HA抗原（１－Ａ）、ならびにA/duck/Hokkaido/9/99 (H9N2)株のNPを遺伝子供与体とした組換え大腸菌発現NP抗原（１－Ｂ）を、精製後SDS-PAGEおよびウェスタンブロット法で純度と市販抗体との反応性を確認した写真である。
【図２】トリインフルエンザのオイルワクチン接種鶏に対して、組換えHA、NP抗原および粘膜アジュバントを経口投与した前後の、抗HA、NP抗体価の推移を定量・グラフ化した図面である。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
本発明は、トリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む免疫材料を提供する。本発明の免疫材料は、好ましくは、インフルエンザを予防するための免疫材料である。
【００１０】
インフルエンザは、基礎疾患を有する患者や高齢者にとって、生命に係わる危険な感染症である。また、最近では、鳥類に感染して起こるトリインフルエンザも流行している。中でも、高病原性トリインフルエンザはA型インフルエンザウイルスによる感染症のうち家禽類のニワトリ・ウズラ・七面鳥等に感染すると非常に高い病原性をもたらすものである。高病原性トリインフルエンザは、静脈への接種で鶏を高率に死亡させるトリインフルエンザウイルスまたは、HAの開裂部位に塩基性のアミノ酸が連続するいわゆる強毒型のウイルスと定義される。
A型インフルエンザはHAの型（およびNAの型）により分類されるが、現在までに見出された高病原性トリインフルエンザはH5、H7亜型に限定されている。これらの亜型ウイルスは、感染を繰り返すうちに強毒化する場合もあり、強毒型、弱毒型に関わらず警戒が必要とされる。
【００１１】
従来、ヒトに感染しないインフルエンザウイルス、たとえばH5、H7のような亜型のウイルスがヒトに感染し、ヒト体内で増殖できるように変異し、最終的にヒトからヒトへ高頻度に感染する能力を備えるようになったウイルスを新型インフルエンザウイルスと呼ぶ。これら新型インフルエンザウイルスに対し、ヒトは免疫を有していないため、この感染拡大は世界的大流行（パンデミック）となるため、甚大な被害が予想される。
【００１２】
「インフルエンザウイルス抗原」は、インフルエンザウイルスを遺伝子供与体とする組換え抗原であり、インフルエンザの感染および発病を予防する能力を備えた抗原を意味する。すでにインフルエンザの予防効果が知られているインフルエンザウイルス抗原としては、ヘマグルチニン（HA）抗原、ノイラミニダーゼ（NA）抗原、NP（核蛋白）抗原、Mタンパク質（マトリックス蛋白質）抗原が例示される。
【００１３】

本発明の免疫材料に含まれるインフルエンザウイルス抗原は、追加経口免疫による免疫再誘導もしくは免疫低下の阻止効果を有する抗原であれば、いかなる亜型ウイルスであっても良い。本発明に用いることが可能な抗原としては（１）ウイルス表面抗原であるHA、NAが例示され、また、（２）ウイルス内部構造の抗原であるNP，Mなども例示されるが、これらに限定されるものではない。PA、PB1、PB2、NS2もまた使用が可能である。また、それらは単独でも良いし、２つ以上の任意の組合せでも良い。

【００１４】

本発明の免疫材料に含まれるインフルエンザウイルス抗原は、好ましくは、ＨＡ抗原及びＮＰ抗原である。本発明のインフルエンザウイルス抗原は上記抗原に限定されず、ＨＡ抗原及びＮＰ抗原と機能的に同等な抗原である限り、自然または人工的に作出された、遺伝子配列やアミノ酸配列が変化した変異体抗原も、本発明に含まれる。本発明においてＨＡ抗原と機能的に同等な抗原とは、ＨＡ抗原と同じ抗原性を有するタンパク質である。また、本発明においてＮＰ抗原と機能的に同等な抗原とは、ＮＰ抗原と同じ抗原性を有するタンパク質である。

【００１５】

本発明の免疫材料に含まれるインフルエンザウイルス抗原は、好ましくは、組み換えＨＡ抗原である。組み換えＨＡ抗原としては以下のタンパク質が例示される。

（ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質；

（ｂ）配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含む核酸によりコードされるタンパク質；

（ｃ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：２に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質；

（ｄ）配列番号：１に記載の塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によりコードされるタンパク質であって、配列番号：２に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【００１６】

本発明の免疫材料に含まれるインフルエンザウイルス抗原は、好ましくは、組み換えＮＰ抗原である。組み換えＮＰ抗原としては以下のタンパク質が例示される。

（ａ）配列番号：４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質；

（ｂ）配列番号：３に記載の塩基配列のコード領域を含む核酸によりコードされるタンパク質；

（ｃ）配列番号：４に記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質；

（ｄ）配列番号：３に記載の塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によりコードされるタンパク質であって、配列番号：４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【００１７】

与えられた塩基配列に対してランダムに変異を加える方法としては、たとえばDNAの亜硝酸処理による塩基対の置換が知られている（Hirose, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:7258-7260, 1982）。この方法では、変異を導入したいセグメントを亜硝酸処理することにより、特定のセグメント内にランダムに塩基対の置換を導入することができる。あるいはまた、目的とする変異を任意の場所にもたらす技術としてはgapped duplex法等がある（Kramer W. and Fritz HJ., Methods in Enzymol., 154:350-367, 1987）。変異を導入すべき遺伝子をクローニングした環状２本鎖のベクターを１本鎖とし、目的とする部位に変異を持つ合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる。制限酵素により切断して線状化させたベクター由来の相補１本鎖DNAを、前記環状１本鎖ベクターにアニールさせ、前記合成ヌクレオチドとの間のギャップをDNAポリメラーゼで充填し、更にライゲーションすることにより完全な２本鎖環状ベクターとする。

改変されるアミノ酸の数は、典型的には50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）であると考えられる。

【００１８】

アミノ酸を人為的に置換する場合、性質の似たアミノ酸に置換すれば、もとのタンパク質の活性が維持されやすいと考えられる。本発明のタンパク質には、上記アミノ酸置換において保存的置換が加えられたタンパク質であって、配列番号：２又は４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。保存的置換は、タンパク質の活性に重要なドメインのアミノ酸を置換する場合などにおいて重要であると考えられる。このようなアミノ酸の保存的置換は、当業者にはよく知られている。

【００１９】

保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などが挙げられる。

また、非保存的置換によりタンパク質の活性などをより上昇（例えば恒常的活性化型タンパク質などを含む）させることも考えられる。

【００２０】

この他、配列番号：２又は４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得る方法として、ハイブリダイゼーションを利用する方法を挙げることができる。すなわち、配列番号：１又は３に示すような本発明のインフルエンザウイルス抗原をコードするDNA又はその断片をプローブとし、これとハイブリダイズすることができるDNAを単離する。ハイブリダイゼーションをストリンジェントな条件下で実施すれば、塩基配列としては相同性の高いDNAが選択され、その結果として単離されるタンパク質にはインフルエンザウイルス抗原と機能的に同等なタンパク質が含まれる可能性が高まる。相同性の高い塩基配列とは、たとえば70%以上、望ましくは90%以上の相同性（同一性）を示すことができる。

【００２１】

なおストリンジェントな条件とは、具体的には例えば 6ＸSSC、40%ホルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1ＸSSC、55℃での洗浄といった条件を示すことができる。ストリンジェンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度などの条件に左右されるが、当業者であればこれらの条件を必要なストリンジェンシーを得られるように設定することは自明である。

ハイブリダイゼーションを利用することによって、たとえば配列番号：２又は４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質以外のインフルエンザウイルス抗原のホモログをコードするDNAの単離が可能である。

【００２２】

配列番号：２又は４に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、配列番号：２又は４に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも30％以上、好ましくは50％以上、さらに好ましくは80％以上（例えば、95％以上）の配列の相同性（同一性）を指す。塩基配列やアミノ酸配列の相同性は、インターネットを利用したホモロジー検索サイトを利用して行うことができる［例えば日本DNAデータバンク（DDBJ）において、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、および SSEARCH 等の相同性検索が利用できる［例えば日本DNAデータバンク（DDBJ）のウェブサイトの相同性検索（Search and Analysis）のページ ; http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html］。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI) において、BLASTを用いた検索を行うことができる（例えばNCBIのホームページのウェブサイトのBLAST

のページ; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402）。］。

【００２３】

例えば Advanced BLAST 2.1におけるアミノ酸配列の同一性の算出は、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、および Lambda ratioをそれぞれ 11、1、0.85（デフォルト値）に設定して検索を行い、同一性（identity）の値（%）を得ることができる（Karlin, S. and S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin, S. and S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7）。

【００２４】

本発明の組み換え抗原としては、経口投与に適している限り特に制限はなく、例えば、大腸菌等の単細胞性原核生物および酵母等の単細胞性真核生物に組換えDNA技術で発現させた抗原や、多細胞生物である昆虫、植物、動物細胞等に発現させた抗原も含まれる。

【００２５】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えば、 Sf9、 Sf21、 Tn5が知られている。本発明においては、CHO-DG44、CHO-DXB11、COS7細胞、BHK細胞が好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポーレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【００２６】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス（Saccharomyces）属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、サッカロミセス・ポンベ（Saccharomyces pombe）、糸状菌、例えば、アスペルギルス（Aspergillus）属、例えば、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）が知られている。

【００２７】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌（E. coli）、例えば、JM109、DH5α、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。本発明のDNAにより形質転換された細胞をin vitroで培養し、当業者が通常行う方法によって精製することによって、本発明の抗原を得ることが可能である。

【００２８】

「粘膜アジュバント」とは、粘膜への投与によって免疫応答を強化する物質を意味する。免疫アジュバントは、アジュバント、ワクチンのためのアジュバント、ワクチン用アジュバント、ワクチンアジュバント、免疫アジュバント組成物、アジュバント組成物、アジュバント用組成物、免疫賦活剤、または免疫増強剤と言い換えることができ、いずれの物質であっても、本発明に記載の免疫アジュバントを意味する。本発明の免疫材料に含まれる粘膜アジュバントとしては、合成オリゴCpG（Ameiss et al., (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:257-67）、レクチン、リポソーム、易熱性大腸菌毒素（またはコレラトキシン）、インターロイキン12が例示されるが、これらに限定されるものではない。本発明の免疫材料に含まれる粘膜アジュバントとしては、好ましくは、合成オリゴCpGである。

【００２９】

本発明は、トリインフルエンザに対するワクチンを投与された動物に対し、トリインフ

ルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む免疫材料を追加投与し、初回免疫で付与された免疫を再誘導させる方法を提供する。したがって、本発明の免疫材料は、追加免疫のために用いられる。

【００３０】

本発明の免疫材料は、既にワクチン投与（例えば、注射による投与）により抗体価が高められた個体に投与すること（追加免疫）により効果を発揮する。これにより該個体の抗体価をさらに高めるもしくは高いレベルに維持できる。例えば、初回免疫としてオイルワクチンを既に接種され、高いレベルの抗体価が既に低下を始めた個体に組換え抗原および粘膜アジュバントを経口投与することにより、抗体価が顕著に再上昇する。

【００３１】

ワクチンの有効性の評価は、ＥＬＩＳＡによる抗体価の測定、ＨＩ価の測定、中和抗体価の測定、マウスなどを用いたウイルスでの攻撃試験による臨床観察や生死判定などで行われ、これらの方法は当業者にとって公知である。

【００３２】

本発明において免疫材料の投与対象となる動物としては、ヒト及びサル並びに鳥類、ウマ、豚等が例示される。好ましくは本発明の免疫材料の投与対象は鳥である。

【００３３】

本発明の免疫材料の投与形態は粘膜投与であり、好ましくは、経口投与である。

【００３４】

本発明の免疫材料は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。

【００３５】

本発明のインフルエンザウイルスを遺伝子供与体とする組換え抗原を経口的に投与する場合、他の成分を配合して投与してもよい。他の成分としては、投与対象の動物の飼料、嗜好性を向上させるための添加剤（ラクトース等）、飲水などとの併用を例示することができる。

【００３６】

投与量は投与対象動物によっても異なるが、例えば、鶏においては、インフルエンザウイルス由来の組換え抗原を、未精製もしくは粗精製物の場合、重量比で5%前後量になるよう通常の餌に混合して摂取させることが好都合である（「遺伝子組換え植物による抗原虫病経口ワクチン[国際公開番号：WO2005/116216]」）。投与量としては、例えば、３～１４日間の間で３～１４回、一回につき一羽あたり精製タンパク質として1mcg（マイクログラム、以下同じ）～100mcgの範囲で選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与間隔については、連続的に投与してもよいし、間隔を空けて投与してもいい。

他の動物の場合も、体重に換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができるが、これらの量に限定されない。好適な投与量は、防御抗原発現量や至適抗体産生、配合飼料の性質などを考慮して決定することができる。

【００３７】

本発明の免疫材料の用途は、以下（１）、（２）のように表現することもできる。

（１）トリインフルエンザに対するワクチンを投与された動物において初回免疫で付与された免疫を再誘導させるための薬剤の製造における、トリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む免疫材料の使用。

（２）トリインフルエンザに対するワクチンを投与された動物において初回免疫で付与された免疫を再誘導させる方法に使用するための、トリインフルエンザウイルス抗原及び経口投与で有効な粘膜アジュバントを含む免疫材料の使用。

【００３８】

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【００３９】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に記載された態様に限定されるものではない。

［実施例１］インフルエンザウイルスを由来とする組換え抗原タンパクおよび粘膜アジュバントの作成

【００４０】

（１）組換えHA抗原の作成

A/duck/Mongolia/54/01 (H5N2)株のHAタンパク質のうちN末端より17番目から528番目のアミノ酸をコードする遺伝子を逆転写PCR法により増幅した。

すなわち、プライマーとして5’-GCC CTA CGT AGA CCA AAT TTG CAT TGG TTA C-3’（配列番号：５）および5’-ATA GTT TAG CGG CCG CTT A TAT TTG GTA AGT TCC-3’（配列番号：６）を使用し、One Step RNA PCR kit (AMV) (TaKaRa社)で逆転写PCRを行った。

得られたcDNA断片（塩基配列　配列番号：１、アミノ酸配列　配列番号：２）を制限酵素SnaBI、NotIを用いて消化しpPIC9Kプラスミド(Multi-Copy Pichia Expression Kit: Invitrogen社)に挿入した。得られたHA発現プラスミドをPichia pastoris GS115株(Multi-Copy Pichia Expression Kit: Invitrogen社)に導入した。この形質転換実験は、Multi-Copy Pichia Expression Kitの取扱説明書に準じて実施した。

【００４１】

得られた形質転換体のうち、組換えHAを発現するクローンをRabbit Polyclonal anti-Avian Influenza A Hemagglutinin抗体(Novus社)およびGoat anti-Rabbit IgG-heavy and light chain cross-adsorbed Antibody HRP Conjugated (Bethyl Laboratories社)を用いたウェスタンブロット法で選抜した。

【００４２】

得られたHA発現酵母をYPD培地(2% glucose、1% yeast extract、2% peptone)に接種して、28℃で一晩振盪培養した。この培養液を、MGY培地(1% glycerol、0.00004% biotin、yeast nitrogen base (Invitrogen社))に接種して、28℃で振盪培養を行いOD_{600}が1.5から2.0に達するまで培養した(16-18時間)。この培養液を無菌的に遠心分離(2,000Ｘg、5分)することで菌体を回収し、得られた酵母菌体をBMMY培地(0.5% methanol、1% yeast extract、2% peptone、0.00004% biotin、yeast nitrogen base (Invitrogen社)、100mM phosphate buffer、pH6.0)に再浮遊した。この懸濁液を28℃で振盪培養し、16時間後にmethanolを培養液容積の0.5%無菌的に添加して、さらに6時間培養した。得られた酵母菌体を5,000Ｘg、15分の遠心分離で回収して-80℃で凍結した。この菌体を解凍後、breaking buffer (50mM Tris-Cl、1mM EDTA、5%glycerol、pH8.0)に再懸濁し、glass beads (425-600 microns、Sigma社)を加えてBioruptor (Cosmo bio社)での破砕(30秒発振・30秒休止、30回、3サイクル)を行った。この抽出液を遠心分離(14,000Ｘg、30分)した上澄みを回収し、0.22mcm（マイクロメートル、以下同じ）のフィルターで清澄化したサンプルを粗抽出液とした。

【００４３】

この粗抽出液をHiPrep 16/10 Q XLカラム(GE healthcare社)で分画した。結合バッファーは20mM Tris-Cl (pH8.0)を、溶出バッファーは20mM Tris-Cl (pH8.0)、1M NaClを使用し、濃度勾配での溶出を行った。組換えHAが含まれる画分は上記と同じ抗体を用いたウェスタンブロット法で選抜した。

回収した画分は、限外ろ過 (分画分子量30kDa)による濃縮と透析を行い、20mM Tris-Cl (pH8.0)、150mM NaClにバッファー交換して使用した。得られた組換えHA抗原は、10% SDS-PAGEおよびウェスタンブロットで精製度を確認した（図１（１－Ａ））。

【００４４】

（２）組換えＮＰ抗原の作成

A/duck/Hokkaido/9/99 (H9N2)株のNP遺伝子を、5’-ACG CGT CGA CGC GCT TCA AGG CAC CAA ACG ATC-3’（配列番号：７）および5’-CCC AAG CTT CTC CTC TGC ATT GTC TCC GAA-3’（配列番号：８）を使用し、One Step RNA PCR kit (AMV) (TaKaRa社)を用いた逆転写PCRで入手した。

このNP遺伝子のcDNA断片(塩基配列　配列番号：３、アミノ酸配列　配列番号：４)を、制限酵素SalIおよびHindIIIで消化し、大腸菌での組換えタンパク質発現用プラスミドベクターpQE31(Qiagen社)に挿入した。この組換えDNAをEscherichia coli M15株に導入し、組換えNPを発現する組換え大腸菌を作成した。この組換え実験は、Qiagen社の取扱説明書に準じて実施した。

【００４５】

得られたNP発現組換え大腸菌をLB培地(1.0% Tryptone、0.5% Yeast extract、1.0% sodium chloride、ampicillin sodium salt 100mcg/ml、kanamycin sulfate 25mcg/ml)に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。この前培養液を100倍量の新鮮なLB培地に接種して、OD_{600}が0.6に達するまで37℃での振盪培養を行った。目的の濁度まで増菌した培養液になるようIPTGを添加して(終濃度1mM)、NPタンパク質発現を誘導するために37℃で一晩振盪培養した。培養後の菌体は、5,000Ｘg、20分の遠心分離によって回収した。この菌体を20mM Tris-HCl (pH 8.0)緩衝液に再懸濁し、溶菌酵素lysozymeを終濃度0.4mg/mlになるように添加して、溶菌反応を氷上で30分間行った。反応終了後、終濃度0.1%になるようsodium deoxychlorateを加えて37℃で30分間保温した。この溶菌液をPolytron (8,000 rpm、2分)で処理した後、10,000Ｘgで30分の遠心分離を行った。

【００４６】

この抽出液50mlに対して5mlのNi-NTA Agarose (Qiagen社)を加えて4℃で1時間結合反応させた。この混合液をPolypropylene Columns (5ml)に添加し、20mlの洗浄バッファーA (20mM Tris-HCl、0.5M NaCl、20mM imidazole、pH8.0)および洗浄バッファーB (20mM Tris-HCl、0.5M NaCl、75mM imidazole、pH8.0)でカラムを洗浄した。その後2.5mlの溶出バッファー(20mM Tris-HCl、0.5M NaCl、250mM imidazole、pH8.0)を4回、カラムに添加して組換えNPを回収した。得られた抗原タンパク質は、20mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5M NaClバッファーで透析して使用した。得られた組換えNP抗原は、10% SDS-PAGEおよびウェスタンブロットで精製度を確認した（図１（１－Ｂ））。

【００４７】

（３）粘膜アジュバントの作成

粘膜アジュバントとして、すでに経口法での免疫賦活効果が報告されたCpG配列5'-GTC GTT GTC GTT GTC GTT-3' (Ameiss et al., (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:257-67、配列番号：９)を使用した。このDNA (CpG-oligo dinucleotide、以下CpG-ODN)の合成をOperon社に依頼するにあたり、消化耐性を高めるために、リン酸骨格の酸素原子を硫黄原子に置換した。

合成したCpG-ODNはエタノール沈殿後、滅菌済みPBS (137mM NaCl、8.1mM Na_2HPO_4、2.68mM KCl、1.47mM KH_2PO_4)に溶解し、試験開始まで-20℃で保存した。

【００４８】

［実施例２］オイルワクチン接種鶏への組換え抗原および粘膜アジュバントの経口投与

初回免疫として、4週齢の白色レグホン(line-M)に対してトリインフルエンザ用オイルワクチンを接種した。具体的には、トリインフルエンザウイルスA/duck/Hokkaido/Vac-1/04 (H5N1)株を種ウイルスとし、10^4TCID50に調製したウイルスを0.2mlずつ11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種した。34℃で72時間の培養を行い、4℃に一晩静置した鶏卵より感染尿膜腔液を回収した。この尿膜腔液を遠心分離 (3,000Ｘg、20分)することで得られた上清に、終濃度0.05% (v/v)になるようbeta-propiolactoneを添加して4℃で5日間の不活化処理を行った。不活化後ウイルス浮遊液のHA価を測定し、PBSで5,120 HAU/mlに調製して抗原液とした。この抗原液にlight liquid paraffinを65%、tetraoleic acid polyoxyethylene (40) sorbitolを1.4% (w/v)、sorbitan sesquioleateを2.0% (w/v)の割合になるよう加えて、乳化機を用いて (循環流量4L/min、8,000rpm、0.5kPa)乳化したものをワク

チンとした。このオイルワクチンのHA価は1,024 HAU/mlであり、鶏1羽あたり0.5ml筋肉内接種を行った。すなわち、1羽あたりの投与抗原量は512HAUである。

【００４９】

このワクチン接種による免疫応答の観察は、被検鶏から1週間ごとに静脈血を採取し、抗体価の推移をELISA法で追跡した。すなわち、0.05Mの炭酸ナトリウム緩衝液(Na_2HCO_3 1.59g/L、NaH_2CO_3 2.93g/L、pH9.6）で0.1mcg/mL濃度に希釈した組換えHAまたはNP抗原を、96穴ELISAプレート（IWAKI社製）に分注して4℃で一晩放置することでコーティング処理した。このプレートをPBS-T緩衝液（0.05% Tween20、137mM NaCl、8.1mM Na_2HPO_4、2.68mM KCl、1.47mM KH_2PO_4)で洗浄後、ウシ血清アルブミンが最終濃度3% (w/v)となるようPBS-T緩衝液に加えたブロッキング液をプレートに分注し、37℃で1時間静置してブロッキング処理した。ブロッキング処理後、PBS-T緩衝液で洗浄後、ウシ血清アルブミンが最終濃度0.3% (w/v)となるようPBS-T緩衝液に加えた抗体希釈用液で、100倍から51,200倍まで2倍階段希釈した被検鶏の血清をプレートに分注し、37℃で1時間静置することで抗原と反応させた。このプレートをPBS-T緩衝液で洗浄後、抗体希釈用液で12,000倍希釈したHRP0標識抗ニワトリIgG（ZYMED社）をプレートに分注し、37℃で1時間反応させた。このプレートをPBS-T緩衝液で洗浄後、基質溶液（Na_2HPO_4 14.6g/L、citrate monohydrate 10.2g/L、ortho-phenylenediamine 1g/L、hydrogen peroxide 1ml/L)をプレートに添加して、37℃で15分間暗所にて静置し反応させた。反応は停止液（5N sulfuric acid)で停止後、ABS 492nmの吸光度値をマイクロプレートリーダー（Corona MTP-120)で測定した。

【００５０】

ELISA抗体価が最高値に達した後、抗体価が減少した鶏（オイルワクチン免疫後19週目)に対して、組換えHAおよびNP抗原と粘膜アジュバントCpG-ODNを経口投与した。具体的には、(i)組換えHA 100mcg、組換えNP 100mcg、CpG-ODN 25mcg投与群、(ii)組換えHA 100mcg、組換えNP 100mcg投与群、(iii)PBS投与群の3群構成で、各群4羽を準備した。各抗原およびCpG-ODNはPBSで総液量2mlに調製し、シリンジを用いた強制飲水による経口投与を実施した。投与は7日間連続で行い、投与期間中から終了後1週間までのELISA抗体価の推移を観察した。

試験結果を図２に示す。

【００５１】

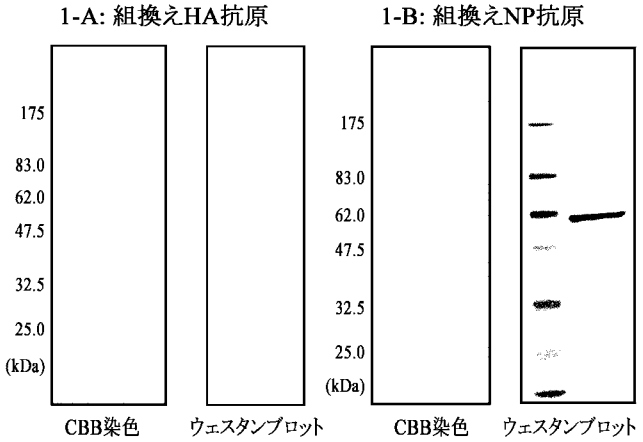
この投与試験の結果、オイルワクチンで付与した免疫応答が弱化しても、組換えHA、NPおよびCpG-ODNを混合して経口投与することで抗体価の再誘導が可能であった(図２、$p<0.05$)。特に、A型インフルエンザの全ての亜型に共通な抗原である、NPに対する免疫の再誘導は顕著だった(図２（２－Ｂ）、$p<0.01$)。なお、今回の発明のワクチンは、初回免疫に使用する場合は無効または効果が弱く、追加免疫に使用する場合に有効であった。

【産業上の利用可能性】

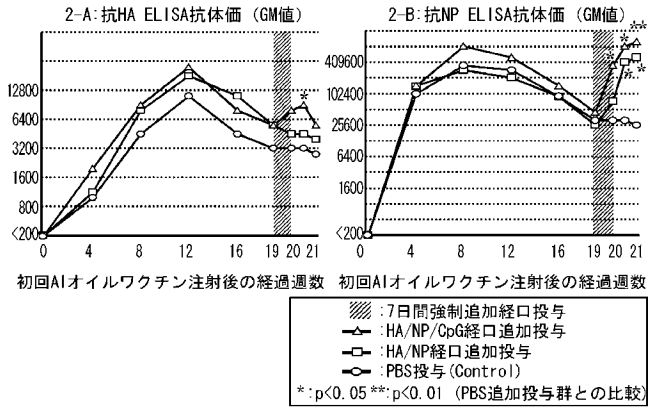
【００５２】

本発明により、オイルワクチンによる初回免疫で付与された免疫をより長期間にわたって高いレベルで維持することが可能な免疫材料及び追加免疫方法が提供された。本発明の免疫材料及び追加免疫方法によって、インフルエンザ予防のためのワクチン接種を簡便かつ合理的に実施することが可能となる。

【図１】



【図２】



【配列表】

2013237673000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 三好 幸宏
埼玉県北本市荒井六丁目１１１番地 学校法人北里研究所生物製剤研究所内
(72)発明者 伊藤 亮
埼玉県北本市荒井六丁目１１１番地 学校法人北里研究所生物製剤研究所内
(72)発明者 諏佐 健太郎
埼玉県北本市荒井六丁目１１１番地 学校法人北里研究所生物製剤研究所内
(72)発明者 姫野 尚美
埼玉県北本市荒井六丁目１１１番地 学校法人北里研究所生物製剤研究所内
(72)発明者 五反田 亨
埼玉県北本市荒井六丁目１１１番地 学校法人北里研究所生物製剤研究所内

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 CA20 DA12 EA04 GA11
4C085 AA03 AA38 BA55 DD62 EE01 FF14 GG08
4H045 BA10 CA01 DA86 EA31 FA74